

5

Membran, Vorrichtung und Verfahren zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten

Die Erfindung betrifft eine Membran zum Entfernen von
10 Proteasen aus Flüssigkeiten, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen, bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zum Ent-
15 fernen von Proteasen aus Flüssigkeiten, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen, mit einer Mehrzahl in Reihe geschalteter Membranen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Entfer-
20 nen von Proteasen aus Flüssigkeiten, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen durch Mikrofiltration mit mikroporösen chemisch aktivierten Membranen.

Die Stabilität pharmazeutischer proteinhaltiger Lösungen
25 ist von verschiedenen Faktoren und vor allem von der Art der Vorbehandlung abhängig. Es ist von größtmöglicher Bedeutung, dass Kontaminationen aller Art aus diesen Lösungen entfernt werden, da die regulatorischen Behörden zahlreiche
30 Kontrollen dieser Prozeduren vorschreiben.

Eine Verunreinigung mit Bakterien oder Pilzen kann beispielsweise leicht dadurch verhindert werden, dass die Lösung durch eine sterilfiltrierende mikroporöse Membran mit
35 bspw. nomineller Porenweite von 0,2 µm filtriert wird. Viren können durch chemische Behandlung oder durch Anwendung

eines stark basischen Ionenaustauschers abgereichert werden. Endotoxine können ebenfalls durch einen basischen Ionenaustauscher oder durch Ultrafiltration entfernt werden.

5 Proteasen sind Enzyme, welche Proteine und Polypeptide abbauen. Dies geschieht durch hydrolytische Spaltung zwischen benachbarten Aminosäuren, welche die Bausteine der Proteine darstellen. Dies führt zur Reduktion des formulierten Proteins, z.B. eines Antikörpers und zum
10 Auftreten von Abbauprodukten, die unerwünschte Effekte in dem mit der Formulierung behandelten Patienten erzeugen.

Während der Aufarbeitung (Down Stream Processing) eines Proteins, z.B. eines gentechnisch hergestellten Antikörpers, der in einer Tierzellkultur produziert wird, kann der
15 Antikörper in der Zelle akkumulieren und muss vor der Aufarbeitung aus der Zelle in das Prozessmedium für die weitere Aufarbeitung freigesetzt werden. Während dieser Zelldesintegration werden gleichzeitig zelleigene Proteasen freigesetzt, welche sofort die Zielproteine abbauen können.
20

Um die Wirkung dieser Proteasen zu unterbinden und zumindest zu verlangsamen, ist es bekannt, kleine synthetische Moleküle mit inhibitorischer Wirkung und sehr hoher Affinität zum aktiven Zentrum der Proteasen zuzusetzen. Nachteilig dabei ist die potentielle Gefährlichkeit solcher Substanzen, ihre geringe Löslichkeit und geringe Stabilität in wässrigen Medien. Deshalb ist eine schnelle und effiziente Verteilung solcher Substanzen in großen Volumina umständlich.
25
30

Weiterhin ist es bekannt, auf dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannten chromatographischen Trägern, wie kugelförmigen Gelen, geeignete Inhibitoren zu immobilisieren. Da die
35 Entfernung wünschenswerterweise möglichst weit „up stream“

in der Reinigungssequenz erfolgen soll, um den Produktverlust gering zu halten, werden für die Aufarbeitung Säulen mit großen Querschnitten benötigt. Dies macht den Schritt kosten- und arbeitsintensiv.

5

Aus der US 6,258,238 B1 ist es bekannt, einen kationischen Protease-Inhibitor durch Bulk-Adsorption an der Oberfläche einer semipermeablen Membran, die mindestens aus einem elektronegativen Polymer besteht, anzuordnen.

10

Nachteilig dabei ist, dass die dabei verwendete Membran bzw. der verwendete Membrankörper nicht elektrisch neutral sondern durch ein verwendetes Monomer negativ geladen ist. Weiterhin ist es schwierig geeignete Inhibitoren für andere
15 Proteaseklassen zu finden.

20

Weiterhin ist aus der DE 44 32 628 A1 eine modular aufgebaute Dead-End-Filtrationseinheit zur selektiven Abtrennung von Stoffen aus Fluiden durch Filtration an porösen Membranabsorbern bekannt. Entsprechend einer spezifischen Adsorption werden die einzelnen abzutrennenden Stoffe in den Filterkassetten bzw. Membranen festgehalten. Mit entsprechenden Eluationsmitteln werden die adsorbierten Stoffe selektiv desorbiert, eluiert und aufgefangen. Bei der aus der
25 DE 44 32 628 A1 bekannten Vorrichtung bzw. bekannten Verfahren werden keine Inhibitor-Membranen verwendet, sondern ionenaustauschende bzw. farbstoffligandentragende Membranen. Bei einer derartigen adsorptiven Anwendung ist es schwierig alle Klassen von bekannten Proteasen an den Membrankörper adsorptiv anzubinden.
30

35

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Membranen zur Entfernung einer Vielzahl von Proteasen aus Flüssigkeiten bereitzustellen, so dass Ihre Wirkung bezüglich der Flüssigkeiten unterbunden oder zumindest verlangsamt wer-

den. Die Entfernung der Proteasen soll schnell, effizient und kostengünstig erfolgen. Dabei soll es möglich sein, saure Proteasen, Metallo-Proteasen, Cystein-Proteasen und Serin-Proteasen selektiv zu entfernen.

5

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 1 dadurch gelöst, dass Proteasen selektiv bindende Inhibitoren durch chemisch aktivierte Gruppen an den Membrankörper angekoppelt sind.

10

Die Verwendung derartiger Membranen hat den Vorteil, dass der konvektive Fluss durch solche Membranen höher ist im Vergleich zu entsprechenden Säulen, da die Diffusionslimitierung des Massentransportes praktisch vernachlässigbar ist. Die Menge an Inhibitor und die zur Kopplung benötigte Membranfläche kann auf die zu entfernende Menge Proteasen abgestimmt werden. Die Membran kann nach Gebrauch verworfen werden, was Reinigungs- und Validierungs-Kosten spart.

15

20 Saure Proteasen, die einen Asparaginsäure-Rest im aktiven Zentrum besitzen, können durch einen entsprechenden Inhibitor an den Membrankörper adsorbiert werden. So kann beispielsweise Pepstatin, dass effizient Pepsin inhibitiert, angekoppelt werden. Metallo-Proteasen, die ein Übergangsmetall, wie z.B. Zink, im aktiven Zentrum besitzen, können
25 beispielsweise durch Bestatin, Diprotin oder EDTA, die an die Membrankörper angekoppelt werden, adsorbiert werden.

25

Cystein-Proteasen, die einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum besitzen, beispielsweise Papain aus der Papaya-Frucht, können durch Antipain, Chymostatin oder E 64, die an den Membrankörper angekoppelt werden, adsorbiert werden.

30

Serin-Proteasen, die wegen ihres ubiquitären Vorkommens
35 wichtigste Familie, können ebenfalls durch entsprechende

35

Inhibitoren, die an den Membrankörper angekoppelt werden, gebunden werden. Als effiziente Inhibitoren kommen TLCK und p-Aminobenzamidin in Frage. Die oben erwähnten Inhibitoren sind kleine Moleküle, zum Teil peptidartige Peptid-Analoga.
5 Sie sind alle kommerziell erhältlich.

Für die Cystein- und Serin-Proteasen existieren weiterhin große proteinartige Inhibitoren, wie Aprotinin, Sojabohnen-, Trypsin-Inhibitoren oder alpha-2-Makroglobulin. Zudem ist
10 eine riesige Anzahl weiterer Inhibitoren in der Literatur beschrieben, die auf die erfindungsgemäße Weise verwendbar sind.

Die bekannten Vorrichtungen weisen die oben beschriebenen
15 Nachteile auf.

Weitere Aufgabe der Erfindung ist es daher, die bekannten Vorrichtungen so zu verbessern, dass eine Vielzahl von Proteasen aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen
20 Lösungen effektiv und kostengünstig entfernt werden können.

Diese weitere Aufgabe wird erfindungsgemäß in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 10 dadurch gelöst, dass die Membranen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ausgebildet
25 sind.

Durch die Ausbildung der Membranen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 weist die Vorrichtung die oben genannten Vorteile auf. Insbesondere wird durch die Reihenschaltung bzw. An-
30 ordnung einer Mehrzahl von Membranen hintereinander gewährleistet, dass die zu prozessierende Flüssigkeit nacheinander alle Membranen sequentiell durchströmt. Die Membranen können dem jeweiligen Trennproblem relativ einfach angepasst werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weisen die einzelnen Membranen jeweils einen Membrankörper mit einem anderen angekoppelten Inhibitor auf.

- 5 Auf diese Weise kann das jeweilige Proteasespektrum der verschiedenen zu prozessierenden Flüssigkeiten für die Aufarbeitung berücksichtigt werden.

Zur einfachen Handhabung werden die einzelnen Membranen zur
10 sequentiellen Durchströmung in geeignete Gehäuse eingebaut.

Die bekannten Verfahren zur Entfernung von Proteasen weisen die oben genannten Nachteile auf.

- 15 Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein effizientes und kostengünstiges Verfahren zum Entfernen einer Vielzahl von Proteasen anzugeben.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des
20 Anspruches 13 dadurch gelöst, dass an die Membranen Inhibitoren über chemisch aktivierte Gruppen angekoppelt werden, durch die die Proteasen durch selektive Anbindung adsorbiert und dadurch aus der Flüssigkeit entfernt werden.

- 25 Durch die selektive Anbindung wird eine effektive und kostengünstige Entfernung einer Vielzahl von Proteasen ermöglicht.

Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der
30 nachfolgenden ausführlichen Beschreibung und der beigefügten Zeichnung, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beispielhaft veranschaulicht sind.

- Figur 1: Eine schematische Darstellung einer Vorrichtung
35 zum Entfernen von Proteasen.

Eine Vorrichtung 1 zum Entfernen von Proteasen besteht im Wesentlichen aus einem Gehäuse 2 und vier in Reihe angeordneten mikroporösen Membranen 3, 4, 5, 6.

5

Die erste Membran 3 weist einen ersten Membrankörper 7 auf, an dem ein saure Proteasen bindender Inhibitor über eine chemisch aktivierte Gruppe angekoppelt ist. Beispielsweise ist Pepstatin als effizienter Inhibitor für Pepsin geeignet.

10

Die zweite Membran 4 weist einen zweiten Membrankörper 8 auf, an dem ein Metallo-Proteasen bindender Inhibitor über eine chemisch aktivierte Gruppe angekoppelt ist. Für die Metallo-Proteasen kommen beispielsweise Bestatin, Diprotin oder EDTA als anzukoppelnde Inhibitoren in Frage.

15

Die dritte Membran 5 weist einen dritten Membrankörper 9 auf, an dem ein Cystein-Proteasen bindender Inhibitor über eine chemisch aktivierte Gruppe angekoppelt ist. Als Inhibitoren sind beispielsweise Antipain, Chymostatin oder E 64 geeignet.

20

Die vierte Membran 6 weist einen vierten Membrankörper 10 auf, an dem ein Serin-Proteasen bindender Inhibitor über eine chemisch aktivierte Gruppe angekoppelt ist.

25

Als Inhibitoren kommen beispielsweise TLCK oder p-Aminobenzamidin in Frage.

Die zu prozessierende Flüssigkeit wird über einen am Gehäuse 2 angeordneten Anschluss 11 der ersten Membran 3 zugeführt, wobei an den Inhibitor des ersten Membrankörpers 7 die entsprechenden sauren Proteasen gebunden werden. Die weiter zu prozessierende Flüssigkeit wird anschließend der zweiten Membran 4 zugeführt, wobei an den Inhibitor des

35

zweiten Membrankörpers 8 die entsprechenden Metallo-Proteasen gebunden werden. Die weiter zu prozessierende Flüssigkeit wird anschließend der dritten Membran 5 zugeführt, wobei an den Inhibitor des dritten Membrankörpers 9 die entsprechenden Cystein-Proteasen gebunden werden. Schließlich wird die weiter zu prozessierende Flüssigkeit der vierten Membran 6 zugeführt, wobei an den Inhibitor des vierten Membrankörpers 10 die entsprechenden Serin-Proteasen gebunden werden.

10

Aus der zu prozessierenden Flüssigkeit sind nunmehr die vorgesehenen Proteasen selektiv entfernt, so dass diese über einen Abfluss 12 einer weiteren Verwendung zugeführt werden kann. Die Membranen 3, 4, 5, 6 mit den gebundenen Proteasen werden weggeworfen bzw. entsorgt.

15

Die folgenden Beispiele zeigen die Möglichkeit der Kupplung verschiedener Inhibitoren an eine chemisch aktivierte Membran bzw. Membrankörper und stellen deshalb keinerlei Einschränkung der Erfindung dar. Die Prozeduren folgen dabei im Wesentlichen dem Protokoll beschrieben in: G.T. Hermanson, A.K. Mallia, P.K. Smith, Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press 1992, p. 119

20

25 Beispiel 1:

Der Serin-Protease Inhibitor p-Aminobenzamidin (Sigma, Deisenhofen Best. Nr. A-7148 wurde in 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 8,0 zu 20 mg/ml gelöst. Zehn epoxy aktivierte Membranen der Abmessung 25 mm Durchmesser des Typs 18706 der Fa. Sartorius AG wurden in dieser Lösung bei 45°C über Nacht inkubiert. Die Membranen/Membrankörper wurden mit PBS mehrfach gewaschen. Drei Membranen mit einem Durchmesser von 25 mm wurden in einen Filterhalter (Sartorius Teil Nr. 16517 eingelegt. Trypsin vom Rinderpankreas (SIGMA Best. Nr. T-8003 Lot Nr. 28F-8065 wurde in PBS zu 1 mg/ml gelöst.

30

35

10 ml dieser Lösung wurde über die Membranen mittels
Schwerkraft filtriert. Die Membranen wurden mit 10 ml PBS
gewaschen. Das gebundene Trypsin wurde mit 3 ml 0,1 M Gly-
zin eingestellt auf pH 3,0 mit HCl eluiert. Die enzymati-
sche Aktivität des Trypsins in den verschiedenen Fraktionen
5 wurde mit dem synthetischen Substrat Benzoyl-Arginin-
Ethylester (BAEE) einem bekannten Substrat für Trypsin in
einem UV- Spektrophotometer bestimmt. Diese wurden mit Ak-
tivitäten von Trypsinlösungen bekannter Konzentration
10 verglichen.

In eine Quarzküvette wurde folgendes pipettiert:

0,85 ml einer Lösung von 0,05 M Tris eingestellt mit HCl
auf pH 8,5, 0,2 ml einer Lösung von 2 mg/ml BAEE in Wasser
15 und 0,05 ml Probe. Die Zunahme der Absorption bei 253 nm
wurde über 30 Sekunden verfolgt.

Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten und sind in Tabel-
le 1 dargestellt.

20 *Tabelle 1: Bindung von Trypsin an eine mikroporöse mit Epo-
xygruppen funktionalisierte Membrane*

Fraktion	Volumen ml	Aktivität E253/min	µg Trypsin angeboten	µg Trypsin gebunden
Ausg.lsg.	10	0,24	2000	--
Durchlauf	10	0,144		930

Der Versuch wurde mit gleichem Ergebnis 2 x wiederholt.

25

Das Beispiel zeigt klar die Bindung von Trypsin an der mit
dem Inhibitor beladenen Membrane/Membrankörper.

30

Beispiel 2:

Der Cystein-Protease Inhibitor Leupeptin (Sigma, Deisenhofen Best. Nr. L-2023) wurde in 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 8,0 zu 20 mg/ml gelöst. Zehn epoxy aktivierte Membranen/Membrankörper der Abmessung 25 mm Durchmesser des Typs 18706 der Fa. Sartorius AG wurden in dieser Lösung bei 45°C über Nacht inkubiert. Die Membranen wurden mit PBS mehrfach gewaschen. Drei Membranen mit einem Durchmesser von 25 mm wurde in einen Filterhalter (Sartorius Teil Nr. 16517 eingelegt. Papain aus Papaya carica (Merck Art. Nr. 7144 Ch. 911 F739244, 30 000 USP - U/mg) wurde zu 2 mg/ml in folgendem gelöst: 1,1 mM EDTA, 0,67 mM Mercaptoethanol, 5,5 mM Cystein 50 mM Na-Azetat pH 5,5; = Komplett und mindestens 30 min bei RT stehen gelassen. Die enzymatische Aktivität des Papains in den verschiedenen Fraktionen wurde mit dem synthetischen Substrat Benzoyl-Arginin-Nitroanilid (BANA), einem bekannten Substrat für Papain in einem UV-Spektrophotometer bestimmt. Diese wurden mit Aktivitäten von Papainlösungen bekannter Konzentration verglichen.

20

In eine Quarzküvette wurde folgendes pipettiert:

0,5 ml Enzymlösung 0,05 ml 25 mg/ml BANA in DMSO, 0,45 ml Komplett.

25 Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten und sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Bindung von Papain an eine mikroporöse mit Leupeptin funktionalisierte Membrane

30

Fraktion	Volumen ml	Aktivität E253/min	µg Papain angeboten	µg Papain gebunden
Ausg.lsg.	5	0,05	1900	--
Durchlauf	5	0,03		760

Der Versuch wurde mit gleichem Ergebnis 2 x wiederholt.

Das Beispiel zeigt klar die Bindung von Papain an der mit
5 dem Inhibitor beladenen Membrane/Membrankörper.

5 Patentansprüche

1. Membran zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten, bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper, **dadurch gekennzeichnet**, dass Proteasen selektiv bindende Inhibitoren durch chemisch aktivierte Gruppen an den Membrankörper (7, 8, 9, 10) angekoppelt sind.

2. Membran nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein saure Proteasen bindender Inhibitor an den Membrankörper (7) angekoppelt ist.

3. Membran nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass Pepstatin an den Membrankörper (7) angekoppelt ist.

4. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Metallo-Proteasen bindender Inhibitor an dem Membrankörper (8) angekoppelt ist.

5. Membran nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass Bestatin, Diprotin oder EDTA an den Membrankörper (8) angekoppelt ist.

6. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Cystein-Proteasen bindender Inhibitor an den Membrankörper (9) angekoppelt ist.

7. Membran nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass Antipain, Chymostatin, Leupeptin oder E64 an den Membrankörper (9) angekoppelt ist.

8. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Serin-Proteasen bindender Inhibitor an den Membrankörper (10) angekoppelt ist.

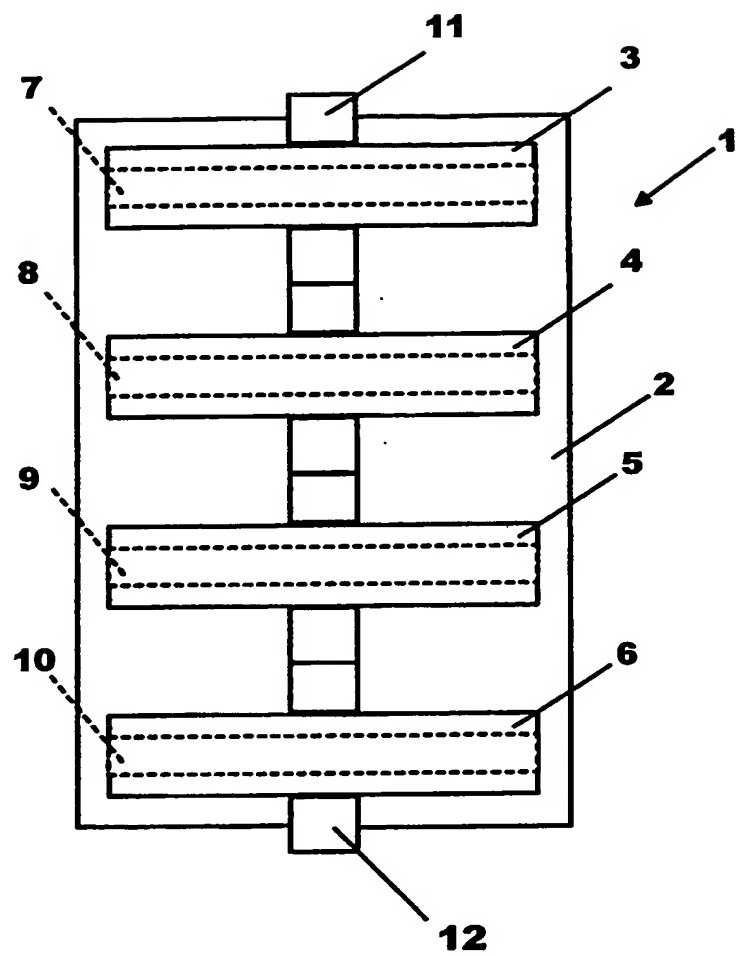
5 9. Membran nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass TLCK oder p-Aminobenzamidin an den Membrankörper (10) angekoppelt ist.

10 10. Vorrichtung zum Entfernen von Proteasen aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen mit einer Mehrzahl in Reihe geschalteter Membranen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Membranen (3, 4, 5, 6) nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ausgebildet sind.

15 11. Vorrichtung nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die einzelnen Membranen (3, 4, 5, 6) jeweils einen Membrankörper (7, 8, 9, 10) mit einem anderen angekoppelten Inhibitor aufweisen.

20 12. Vorrichtung nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Membranen (3, 4, 5, 6) in ein zur sequentiellen Durchströmung der Membranen (3, 4, 5, 6) geeignetes Gehäuse (2) eingebaut sind.

25 13. Verfahren zum Entfernen von Proteasen aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen durch Mikrofiltration mit mikroporösen aktivierten Membranen, **dadurch gekennzeichnet**, dass an die Membranen (3, 4, 5, 6) Inhibitoren über chemisch aktivierte Gruppen angekoppelt werden, durch
30 die die Proteasen durch selektive Anbindung entfernt werden.

**Fig. 1**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/06366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01J20/32 B01D15/00 B01D69/02 C12N9/50 C07K14/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 B01J B01D C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 2002 (2002-04) GRANO V ET AL: "The alpha1-antitrypsin/elastase complex as an experimental model for hemodialysis in acute catabolic renal failure, extracorporeal blood circulation and cardiocirculatory bypass." Database accession no. PREV200200383791 XP002256587	1, 13
Y	abstract & INTERNATIONAL JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS, vol. 25, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 297-305, ISSN: 0391-3988 --- -/--	4, 6-8, 10-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 2003

Date of mailing of the international search report

10/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hilgenga, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/06366

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96 40737 A (ARRIS PHARM CORP) 19 December 1996 (1996-12-19) page 7, line 13 - line 16 page 7, line 23 page 8, line 21 - line 28 ---	4,6-8
Y	DE 44 32 628 A (SARTORIUS GMBH) 21 March 1996 (1996-03-21) cited in the application the whole document ---	10-12
P,X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 20 January 2003 (2003-01-20) GRANO V ET AL: "Protease removal by means of antiproteases immobilized on supports as a potential tool for hemodialysis or extracorporeal blood circulation." Database accession no. PREV200300399216 XP002256588 abstract & INTERNATIONAL JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS, vol. 26, no. 1, 20 January 2003 (2003-01-20), pages 39-45, ISSN: 0391-3988 ---	1,13
X	US 4 163 714 A (GREGOR HARRY P) 7 August 1979 (1979-08-07) the whole document ---	1,10,13
A	US 6 248 238 B1 (THOMAS MICHEL ET AL) 19 June 2001 (2001-06-19) cited in the application the whole document ---	1,13
A	US 4 033 817 A (GREGOR HARRY P) 5 July 1977 (1977-07-05) column 6, line 11 - line 40 ---	1,10,13
P,A	WO 02 060952 A (CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL SERVICES) 8 August 2002 (2002-08-08) page 15, line 5 - line 15; claim 24 ---	1,8
A	US 4 639 513 A (HOU KENNETH C ET AL) 27 January 1987 (1987-01-27) column 23, line 40 - column 33, line 42 column 33, line 33 - line 34 ---	
A	US 4 171 412 A (BLAHA KAREL ET AL) 16 October 1979 (1979-10-16) the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 03/06366

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9640737	A	19-12-1996	AU 723658 B2	31-08-2000
			AU 5975596 A	30-12-1996
			CA 2222972 A1	19-12-1996
			CN 1192219 A	02-09-1998
			CZ 9703906 A3	15-04-1998
			EP 0832099 A1	01-04-1998
			JP 11507045 T	22-06-1999
			NO 975742 A	05-02-1998
			NZ 309560 A	30-08-1999
			PL 323710 A1	14-04-1998
			TW 438591 B	07-06-2001
			WO 9640737 A1	19-12-1996
			US 6030946 A	29-02-2000
			ZA 9604751 A	08-01-1997
DE 4432628	A	21-03-1996	DE 4432628 A1	21-03-1996
			DE 29514281 U1	07-12-1995
			FR 2724326 A1	15-03-1996
			GB 2293119 A , B	20-03-1996
			JP 8103638 A	23-04-1996
			US 5618418 A	08-04-1997
US 4163714	A	07-08-1979	CA 1082625 A1	29-07-1980
			DE 2650921 A1	18-05-1977
			FR 2330694 A1	03-06-1977
			GB 1519650 A	02-08-1978
			IT 1066729 B	12-03-1985
			JP 52084185 A	13-07-1977
US 6248238	B1	19-06-2001	FR 2747590 A1	24-10-1997
			FR 2747591 A1	24-10-1997
			AT 219951 T	15-07-2002
			DE 69713667 D1	08-08-2002
			DE 69713667 T2	13-02-2003
			EP 0801953 A1	22-10-1997
			ES 2177917 T3	16-12-2002
			JP 10057479 A	03-03-1998
US 4033817,	A	05-07-1977	CA 1083057 A1	05-08-1980
			DE 2650920 A1	18-05-1977
			FR 2330695 A1	03-06-1977
			GB 1519676 A	02-08-1978
			IT 1121686 B	10-04-1986
			JP 1280172 C	13-09-1985
			JP 52083995 A	13-07-1977
			JP 59050317 B	07-12-1984
WO 02060952	A	08-08-2002	WO 02060952 A1	08-08-2002
US 4639513	A	27-01-1987	US 4663163 A	05-05-1987
			EP 0180766 A2	14-05-1986
			JP 61087631 A	06-05-1986
			US 5059654 A	22-10-1991
			US 4724207 A	09-02-1988
			US 4791063 A	13-12-1988
US 4171412	A	16-10-1979	CS 175047 B1	29-04-1977
			AT 343602 B	12-06-1978

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP-03/06366

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4171412	A	AT 313575 A	15-10-1977
		AU 8041075 A	28-10-1976
		BE 828373 A1	18-08-1975
		CA 1066847 A1	20-11-1979
		CH 629509 A5	30-04-1982
		DE 2518352 A1	06-11-1975
		FR 2268824 A1	21-11-1975
		GB 1492829 A	23-11-1977
		JP 1170092 C	17-10-1983
		JP 50144688 A	20-11-1975
		JP 58004576 B	27-01-1983
		NL 7504877 A ,B,	28-10-1975
		SE 400835 B	10-04-1978
		SE 7504655 A	27-10-1975

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationalen Zeichen
PCT/EP 03/06366

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 B01J20/32 B01D15/00 B01D69/02 C12N9/50 C07K14/81		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 B01J B01D C07K C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 2002 (2002-04) GRANO V ET AL: "The alpha1-antitrypsin/elastase complex as an experimental model for hemodialysis in acute catabolic renal failure, extracorporeal blood circulation and cardiocirculatory bypass." Database accession no. PREV200200383791 XP002256587	1,13
Y	Zusammenfassung & INTERNATIONAL JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS, Bd. 25, Nr. 4, April 2002 (2002-04), Seiten 297-305, ISSN: 0391-3988 --- -/--	4,6-8, 10-12
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<ul style="list-style-type: none"> * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist 		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 27. Oktober 2003		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 10/11/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Hilgenga, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 96 40737 A (ARRIS PHARM CORP) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Seite 7, Zeile 13 - Zeile 16 Seite 7, Zeile 23 Seite 8, Zeile 21 - Zeile 28 ---	4,6-8
Y	DE 44 32 628 A (SARTORIUS GMBH) 21. März 1996 (1996-03-21) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	10-12
P,X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 20. Januar 2003 (2003-01-20) GRANO V ET AL: "Protease removal by means of antiproteases immobilized on supports as a potential tool for hemodialysis or extracorporeal blood circulation." Database accession no. PREV200300399216 XP002256588 Zusammenfassung & INTERNATIONAL JOURNAL OF ARTIFICIAL ORGANS, Bd. 26, Nr. 1, 20. Januar 2003 (2003-01-20), Seiten 39-45, ISSN: 0391-3988 ---	1,13
X	US 4 163 714 A (GREGOR HARRY P) 7. August 1979 (1979-08-07) das ganze Dokument ---	1,10,13
A	US 6 248 238 B1 (THOMAS MICHEL ET AL) 19. Juni 2001 (2001-06-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1,13
A	US 4 033 817 A (GREGOR HARRY P) 5. Juli 1977 (1977-07-05) Spalte 6, Zeile 11 - Zeile 40 ---	1,10,13
P,A	WO 02 060952 A (CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL SERVICES) 8. August 2002 (2002-08-08) Seite 15, Zeile 5 - Zeile 15; Anspruch 24 ---	1,8
A	US 4 639 513 A (HOU KENNETH C ET AL) 27. Januar 1987 (1987-01-27) Spalte 23, Zeile 40 - Spalte 33, Zeile 42 Spalte 33, Zeile 33 - Zeile 34 ---	
A	US 4 171 412 A (BLAHA KAREL ET AL) 16. Oktober 1979 (1979-10-16) das ganze Dokument -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die von der Patentfamilie gehören

Internationaler Zeichen

PCT/EP 03/06366

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9640737	A	19-12-1996	AU 723658 B2 31-08-2000
		AU 5975596 A 30-12-1996	
		CA 2222972 A1 19-12-1996	
		CN 1192219 A 02-09-1998	
		CZ 9703906 A3 15-04-1998	
		EP 0832099 A1 01-04-1998	
		JP 11507045 T 22-06-1999	
		NO 975742 A 05-02-1998	
		NZ 309560 A 30-08-1999	
		PL 323710 A1 14-04-1998	
		TW 438591 B 07-06-2001	
		WO 9640737 A1 19-12-1996	
		US 6030946 A 29-02-2000	
		ZA 9604751 A 08-01-1997	
DE 4432628	A	21-03-1996	DE 4432628 A1 21-03-1996
		DE 29514281 U1 07-12-1995	
		FR 2724326 A1 15-03-1996	
		GB 2293119 A ,B 20-03-1996	
		JP 8103638 A 23-04-1996	
		US 5618418 A 08-04-1997	
US 4163714	A	07-08-1979	CA 1082625 A1 29-07-1980
		DE 2650921 A1 18-05-1977	
		FR 2330694 A1 03-06-1977	
		GB 1519650 A 02-08-1978	
		IT 1066729 B 12-03-1985	
		JP 52084185 A 13-07-1977	
US 6248238	B1	19-06-2001	FR 2747590 A1 24-10-1997
		FR 2747591 A1 24-10-1997	
		AT 219951 T 15-07-2002	
		DE 69713667 D1 08-08-2002	
		DE 69713667 T2 13-02-2003	
		EP 0801953 A1 22-10-1997	
		ES 2177917 T3 16-12-2002	
		JP 10057479 A 03-03-1998	
US 4033817	A	05-07-1977	CA 1083057 A1 05-08-1980
		DE 2650920 A1 18-05-1977	
		FR 2330695 A1 03-06-1977	
		GB 1519676 A 02-08-1978	
		IT 1121686 B 10-04-1986	
		JP 1280172 C 13-09-1985	
		JP 52083995 A 13-07-1977	
		JP 59050317 B 07-12-1984	
WO 02060952	A	08-08-2002	WO 02060952 A1 08-08-2002
US 4639513	A	27-01-1987	US 4663163 A 05-05-1987
		EP 0180766 A2 14-05-1986	
		JP 61087631 A 06-05-1986	
		US 5059654 A 22-10-1991	
		US 4724207 A 09-02-1988	
		US 4791063 A 13-12-1988	
US 4171412	A	16-10-1979	CS 175047 B1 29-04-1977
		AT 343602 B 12-06-1978	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Rechen

PCT/EP 03/06366

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4171412 A		AT 313575 A	15-10-1977
		AU 8041075 A	28-10-1976
		BE 828373 A1	18-08-1975
		CA 1066847 A1	20-11-1979
		CH 629509 A5	30-04-1982
		DE 2518352 A1	06-11-1975
		FR 2268824 A1	21-11-1975
		GB 1492829 A	23-11-1977
		JP 1170092 C	17-10-1983
		JP 50144688 A	20-11-1975
		JP 58004576 B	27-01-1983
		NL 7504877 A ,B,	28-10-1975
		SE 400835 B	10-04-1978
		SE 7504655 A	27-10-1975